BIOHIT HealthCare

Innovating for Health

BIOHIT ACTIVE B12

(HOLOTRANSCOBALAMIN)

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

602 290

For *in vitro* diagnostic use

Store at 2-8 °C Upon Receipt

Biohit Oyj Laippatie 1, FI-00880 Helsinki, Finland

Tel. +358 9 773 861, info@biohit.fi, www.biohithealthcare.com

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO **Português**

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) N.º Cat. 602290

1. UTILIZAÇÃO PREVISTA

O ensaio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) é um imunoensaio enzimático (EIA) para a determinação quantitativa da holotranscobalamina (HoloTC) no soro humano. A HoloTC (vitamina B12 ligada à transcobalamina) é utilizada como uma ajuda no diagnóstico e no tratamento da deficiência de vitamina B12.

2. INTRODUÇÃO

Três proteínas de ligação estão envolvidas no transporte da vitamina B12 por todo o corpo - o factor intrínseco (FI), a transcobalamina (TC) e a haptocorrina (HC). Estas proteínas de ligação asseguram a captação eficiente das quantidades muito pequenas de vitamina B12 disponibilizadas pela alimentação. Quando a TC e a HC se ligam à vitamina B12, os complexos resultantes são conhecidos como holotranscobalamina (HoloTC) e holohaptocorrina (HoloHC) para as distinguir das proteínas que não transportam vitamina.
A fracção principal na circulação, a HoloHC, representa 70-90% da vitamina B12 no sangue, mas é biologicamente inerte. A HoloTC representa apenas 10-30% da vitamina B12 que circula no sangue, mas é a única forma de vitamina B12 que pode ser captada pelas células no corpo. A proteína TC por si só transporta vitamina B12 do seu local de absorção no íleo para os tecidos e as células. Em seguida, a vitamina é incorporada na forma do complexo HoloTC (vitamina B12 ligada à transcobalamina) através de uma captação específica mediada por receptores. Este processo fornece vitamina B12 às células do corpo e proporciona a vitamina na forma de uma co-enzima para as funções celulares essenciais, tais como a síntese do ADN.
Uma vez que a HoloTC possui uma semi-vida de circulação mais curta comparativamente com a HoloHC, é provável que a primeira alteração a ocorrer ao entrar em balanço negativo de vitamina B12 seja uma diminuição na concentração sérica da HoloTC[1].

A medição da B12 sérica total sofre de algumas limitações, em particular, a maioria da cobalamina medida está ligada a HC biologicamente inerte. Foram publicados vários estudos que concluem que a HoloTC seria um melhor indicador do estado da vitamina B12 do que a B12 sérica total[2,3]. Conforme previsto, os níveis de HoloTC são baixos em doentes com sinais bioquímicos de deficiência de vitamina B12[4].

Foram observados valores baixos em vegetarianos[5], veganos[6] e em populações com uma ingestão baixa de vitamina B12[7]. É de salientar que foram observados níveis baixos de HoloTC, mas não de B12 sérica total, em doentes com doença de Alzheimer comparativamente com os níveis num grupo de controlo saudável[8]. Os níveis de HoloTC reflectem o estado da vitamina B12, independentemente da absorção recente da vitamina[9].

3. PRINCÍPIO DO TESTE

Os poços de microtitulação são revestidos com um anticorpo monoclonal altamente específico para BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin). Durante a primeira incubação, a holotranscobalamina sérica liga-se especificamente à superfície revestida com anticorpo. Na segunda incubação, o conjugado liga-se a toda a holotranscobalamina capturada. Os poços são depois lavados para remover componentes não ligados. A holotranscobalamina ligada é detectada pela incubação com o substrato. A reacção termina por adição da solução de paragem, resultando num produto final colorido. A concentração de holotranscobalamina em pmol/L

está directamente relacionada com a cor gerada e pode ser calculada por interpolação a partir de uma curva de dose-resposta baseada nos calibradores.

4. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES

Apenas para utilização em diagnóstico *in vitro*. Precauções de segurança

1. Siga rigorosamente as instruções nesta brochura, em particular as relativas a condições de manuseamento e conservação.
2. Não faça pipetagem com a boca.
3. Não fume, coma, beba nem aplique cosméticos em áreas onde os kits e as amostras são manuseados.
4. Quaisquer problemas de pele, cortes, abrasões e outras lesões cutâneas devem ser devidamente protegidos.
5. Os calibradores, os controlos, o conjugado, o pré-tratamento e o concentrado de tampão de lavagem contêm azida de sódio, a qual pode reagir com a canalização de chumbo e cobre, formando azidas metálicas altamente explosivas. Ao eliminar os resíduos, escoe com grandes quantidades de água para prevenir a acumulação de azidas.
6. A solução de paragem contém hidróxido de sódio. Evitar o contacto com a pele, os olhos e as membranas mucosas. O derramamento pode ser limpo com quantidades abundantes de água. Em caso de contacto com a pele ou os olhos, lavar com água e procurar assistência médica imediatamente.
7. Estão disponíveis fichas de dados de segurança dos materiais para todos os componentes incluídos neste kit mediante solicitação à Biohit Oyj.
8. Este produto envolve o manuseamento de espécimes e materiais de origem humana e animal. Recomenda-se que todos os materiais de origem humana e animal sejam considerados potencialmente infecciosos e sejam manuseados de acordo com a norma OSHA para Patógenos de Transmissão Sanguínea de Biossegurança Nível 2, ou que sejam usadas outras práticas de biossegurança adequadas para materiais que contenham ou se suspeite conterem agentes infecciosos.

CORROSIVO	Solução de paragem	R34 S26 S36/37/39 S45	Provoca queimaduras. Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e procurar assistência médica. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados. Em caso de acidente ou de indisposição, procurar assistência médica imediatamente (se possível mostrar o rótulo).
NOCIVO	Substrato	R20/21/22 R38 R43 S23 S24 S28 S29/35 S36/37/39 S46	Nocivo por inalação, em contacto com a pele e por ingestão. Irritante para a pele. Pode causar sensibilização em contacto com a pele. Não respirar os fumos. Evitar o contacto com a pele. Após contacto com a pele, lavar imediatamente e abundantemente com água. Não deitar os resíduos no esgoto; eliminar este produto e respectivo recipiente de forma segura. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados. Em caso de ingestão, procurar assistência médica imediatamente e mostrar a embalagem.
	Concentrado de tampão de lavagem (8X)	R22 R32 R52/53 S29/35 S36/37/39 S46	Nocivo por ingestão. Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos. Nocivo para os organismos aquáticos, podendo causar efeitos nefastos a longo prazo no ambiente aquático. Não deitar os resíduos no esgoto; eliminar este produto e respectivo recipiente de forma segura. Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados. Em caso de ingestão, procurar assistência médica imediatamente e mostrar a embalagem ou o rótulo.

5. CONTEÚDO DO KIT

5.1 Solução de conjugado CONJ

Um frasco de 15 mL de anticorpo monoclonal murino marcado com fosfatase alcalina para a transcobalamina humana em tampão Tris com estabilizador de proteínas. Conservante: azida de sódio a < 0,1% (p/v). Pronto a utilizar.

5.2 Solução de substrato SUBS

Um frasco de 15 mL de p-nitrofenil-fosfato (pNPP), solução tampão. Pronto a utilizar. Não expor à luz durante a conservação.

OBS.: NOCIVO.

5.3 Solução de paragem STOP

Um frasco de 15 mL de hidróxido de sódio 1M, (pH >10).

Pronto a utilizar. OBS.: CORROSIVO.

5.4 Concentrado de tampão de lavagem WASH 8x

Dois frascos de 25 mL de tampão fosfato. Conservante: azida de sódio a 0,72% (p/v).

Diluir antes de utilizar. OBS.: NOCIVO.

5.5 Microplaca

Tiras de microtitulação (separáveis) com 12 × 8 poços revestidos com anticorpo monoclonal murino anti-holotranscobalamina, num invólucro de alumínio com dissecante e selo reutilizável.

5.6 Solução em branco BLANK

Um frasco de 1 mL de tampão fosfato com estabilizador (bovino) de proteínas.

5.7 Calibradores CAL 1-5

Cinco frascos de 1 mL de tampão fosfato com estabilizador (bovino) de proteínas contendo HoloTC.

Conservante: azida de sódio a < 0,1% (p/v). Pronto a utilizar. Não expor à luz durante a conservação.

PARA CONCENTRAÇÕES VER RÓTULOS DOS FRASCOS.

5.8 Controlos CONTROL LOW CONTROL HIGH

Um frasco de controlo baixo e um frasco de controlo alto: 1 mL de tampão fosfato com estabilizador (bovino) de proteínas contendo HoloTC. Conservante: azida de sódio a < 0,1% (p/v).

Pronto a utilizar. Não expor à luz durante a conservação.

5.9 Solução de pré-tratamento PRE

Um frasco de 25 mL de tampão citrato. Conservante: azida de sódio a < 0,1% (p/v). Pronto a utilizar.

5.10 Instruções de utilização

6. MATERIAIS/EQUIPAMENTO NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

1. Leitor de tira/placa de 96 poços com filtro de 405 nm.
2. Pipeta(s) de precisão para distribuir 100 µL. Um distribuidor de 8 canais, ou semelhante, para distribuir aproximadamente 250-300 µL para a lavagem manual.
3. Cilindro de medição de vidro/plástico 1×200 mL.
4. Água destilada/desionizada.
5. Toalhas de papel.
6. Temporizador para intervalos de 30, 35 e 60 minutos.

7. NORMALIZAÇÃO

Não existe actualmente um método ou material de referência para normalização que seja internacionalmente aceite. Os calibradores BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) são rastreáveis de acordo com padrões de referência internos que foram submetidos a um processo de atribuição de valor único.

8.CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

8.1 Estabilidade do kit aberto (em utilização)

Um kit foi aberto e reutilizado em três ocasiões, durante um período de três meses, sem quaisquer efeitos adversos no desempenho do kit. Após a utilização, os componentes têm de ser novamente conservados a 2-8°C.

8.2 Estabilidade do kit não aberto

Os componentes não abertos mantêm-se estáveis, a temperaturas entre 2°C e 8°C, até à data indicada nas etiquetas.

8.3 Notas sobre manuseamento e procedimentos

1. Conserve os componentes do kit a 2-8°C e utilize antes do prazo de validade indicado nos rótulos. Não utilize reagentes cujo prazo de validade tenha expirado.
2. Cada lote de reagentes e calibradores foi padronizado para produzir a reacção correcta. Não troque reagentes nem calibradores entre lotes.
3. As concentrações dos calibradores são apresentadas nos rótulos dos frascos e podem variar entre lotes.
4. Não congele os kits.
5. Concentrado de tampão de lavagem deve ser diluído antes da sua utilização. Todos os outros reagentes estão prontos a utilizar.
6. Tampão de lavagem diluído permanece estável durante pelo menos 3 meses se for evitada uma contaminação microbiana. Voltar a conservar a 2-8°C depois de cada utilização.
7. Volte a colocar as tiras de microtitulação excedentes (não utilizadas) no invólucro de alumínio com o dessecante. Certifique-se de que o selo está intacto e volte a colocar a 2-8ºC, até que sejam novamente necessárias.
8. Não exponha os calibradores, os controlos e o substrato à luz durante a conservação.

9. Evite a contaminação dos reagentes. Utilize uma ponta de pipeta descartável nova para cada reagente ou cada manipulação da amostra.

8.4 Indicadores de deterioração

O substrato deve ser incolor ou apresentar uma coloração amarelo pálido. Uma coloração de amarelo mais escuro indica contaminação e o reagente deve ser eliminado. Turvação ou precipitação de qualquer componente é indicadora de deterioração, devendo o componente ser eliminado.

9. COLHEITA E CONSERVAÇÃO DA AMOSTRA

1. Este ensaio é recomendado para soro humano (incluindo tubos separadores de soro).
2. Não utilize amostras claramente hemolisadas ou turvas.
3. Misture cuidadosamente amostras descongeladas antes do ensaio e evite repetir o processo de congelamento/descongelamento.
4. As amostras podem ser submetidas a 3 ciclos de congelamento/descongelamento. As amostras descongeladas devem ser centrifugadas a ≥10.000 g durante 5 minutos antes do ensaio.
5. Não exponha as amostras on-the-clot e off-the-clot a temperaturas superiores à temperatura ambiente por um período superior a uma noite (≤ 16 horas).
6. As amostras podem ser conservadas a temperaturas entre 2 e 8°C, durante 3 dias no estado on-the-clot e durante quatro semanas no estado off-the-clot. Para períodos de armazenamento superiores, as amostras têm de ser conservadas em estado off-the-clot a -20°C por um período máximo de 6 meses.
7. Prepare cada amostra antes do ensaio adicionando um volume igual de pré-tratamento à amostra, p. ex., 150 µL de amostra mais 150 µL de pré-tratamento. As amostras pré-tratadas podem ser conservadas tapadas durante um máximo de 24 horas a 2-8°C antes do ensaio.

10. PROCEDIMENTO DE TESTE

10.1 Preparação

Preparação para o ensaio

Permita que todos os componentes do kit, incluindo as tiras de microtitulação, aqueçam até temperaturas de 18-25°C, durante 30-60 minutos antes de utilizar. Misture os reagentes por inversão cuidadosa.

Quando conservado a 2-8°C, o tampão de lavagem forma um precipitado (podem ser visíveis cristais). Antes de diluir em água, permita que o tampão de lavagem aqueça (pode ser colocado num incubador a 37°C, se necessário, a fim de acelerar o processo) até que **NENHUMA** precipitação seja evidente a olho nú.

Dilua o seguinte reagente e misture cuidadosamente:

Reagente	Volume	Adicionar
Concentrado de tampão de lavagem x 8	1 frasco	175 mL de água destilada/desionizada

Calcule o número de tiras de microtitulação necessárias para o presente ensaio e fixe-as no suporte de tiras de microtitulação. Volte a colocar as tiras excedentes no invólucro de alumínio com selo reutilizável com o dissecante e conserve a 2-8°C até serem novamente necessárias. Certifique-se de que todas as tiras estão firmemente fixas ao suporte de tiras de microtitulação. Os utilizadores poderão optar por numerar cada tira ao longo da margem superior para facilitar a respectiva identificação. Guarde o suporte de tiras de microtitulação para utilização futura. Prepare cada amostra antes do ensaio adicionando um volume igual de pré-tratamento à amostra, p. ex., 150 µL de amostra mais 150 µL de pré-tratamento. As amostras pré-tratadas podem ser conservadas tapadas durante um máximo de 24 horas a 2-8°C antes do ensaio.

10.2 Protocolo de ensaio

1. Marque os poços para fins de identificação.
2. Pipete 100 µL de calibradores em duplicado, controlos do kit em duplicado e amostras pré-tratadas (50:50) do doente em duplicado nos poços apropriados. Não esqueça de mudar as pontas das pipetas entre pipetagens. Este passo não deve exceder 15 minutos.
3. Proceda à incubação durante 60±10 minutos a 18-25°C.
4. Decante os conteúdos das tiras por inversão rápida para um lavatório adequado para a eliminação de materiais biológicos, tendo em conta o potencial risco infeccioso das amostras. Seque bem as tiras invertidas com toalhas de papel. **Não lavar.**
5. Adicione a cada poço 100 µL de conjugado.
6. Proceda à incubação durante 35±5 minutos a 18-25°C.
7. Decante os conteúdos das tiras por inversão rápida para um lavatório adequado para a eliminação de materiais biológicos. Seque bem as tiras invertidas com toalhas de papel.
8. Lave os poços **cinco vezes** com um mínimo de 250 µL de tampão de lavagem diluído. **Decante e seque após cada adição de lavagem.**
9. Adicione a cada poço 100 µL de substrato.
10. Proceda à incubação durante 30±5 minutos a 18-25°C. **Não decante.**
11. Adicione 100 µL de solução de paragem a cada poço, pela mesma ordem e velocidade da adição de substrato. Bata os poços suavemente para misturar.
12. Efectue a leitura das tiras a 405 nm. Efectue a leitura no prazo de 120 minutos a partir da adição da solução de paragem.

11. RESULTADOS

11.1. Cálculos e interpretação

Trace o valor médio de absorvância de cada calibrador no eixo y em função da concentração correspondente em pmol/l no eixo x. **AS CONCENTRAÇÕES DOS CALIBRADORES SÃO APRESENTADAS NOS RÓTULOS DOS FRASCOS. OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO SÃO ATRIBUÍDOS A CADA LOTE DE CALIBRADORES E PODEM VARIAR ENTRE LOTES.**

A concentração (pmol/l) de cada amostra pode ser calculada localizando o ponto na curva correspondente ao valor de absorvância média da amostra e fazendo a leitura da concentração correspondente em pmol/l no eixo das abcissas (x). Este procedimento pode ser efectuado manualmente usando um gráfico em papel ou utilizando um leitor de placas com software que incorpora procedimentos de ajuste de curvas. Se for utilizado um leitor de placas com software interno, deve ser utilizado **um algoritmo de ajuste de curvas de regressão linear**.

Abaixo está representado um gráfico de calibração típico (Figura 1) apenas para efeitos ilustrativos e que não deve ser usado para interpretação de resultados. Amostras com concentrações superiores a 128 pmol/l estão fora dos limites do ensaio, devendo ser registadas como >128 pmol/l e os resultados não podem ser extrapolados. Podem ser obtidos replicados de amostras individuais com desvio inferior a 20% para indicar aceitabilidade do ensaio.

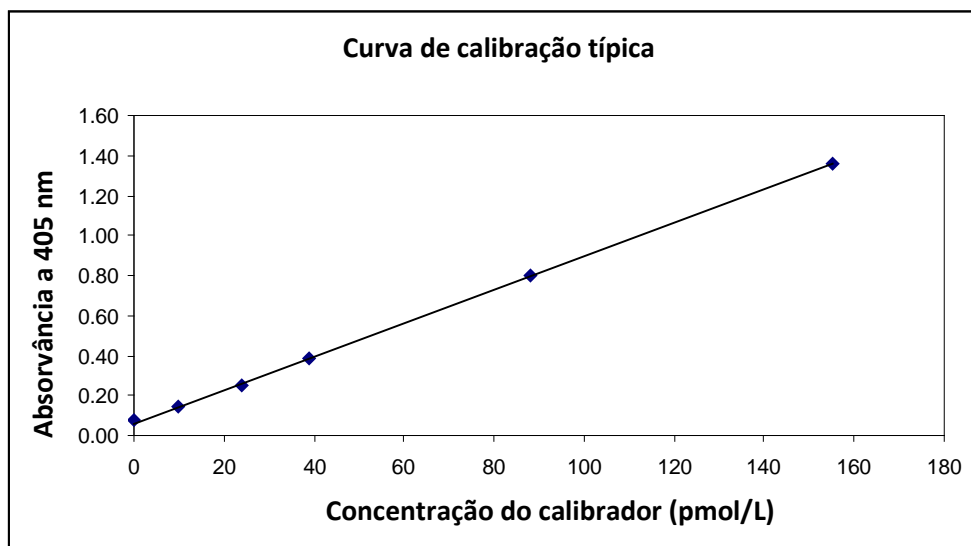



Figura 1. Curva de calibração típica do ensaio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin).

Unidade de medida

A unidade de medida para o ensaio BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) é a pmol/l.

Intervalo de medição (limites reportáveis)

O intervalo de medição do ensaio situa-se entre 10 pmol/l e 128 pmol/l.

11.2 Controlo de qualidade

Certifique-se de que são efectuadas manutenção e calibração adequadas do leitor de placas, de acordo com as instruções do fabricante, e que são empregues o comprimento de onda (405 nm) e o algoritmo de ajuste de curva (regressão linear) correctos.
Os utilizadores devem certificar-se de que estão completamente familiarizados com as instruções do ensaio, particularmente com a secção de Advertências e Precauções e as Notas sobre manuseamento e procedimentos.
Os utilizadores devem demonstrar que conseguem obter especificações de desempenho de precisão e intervalos de resultados de testes documentáveis, comparáveis com os estabelecidos pelo fabricante, antes de documentar resultados de testes em doentes. Os controlos alto e baixo prontos a utilizar do kit devem ser testados em duplicado em todos os ensaios para monitorizar a qualidade do procedimento de teste.
Assumindo que as especificações de precisão descritas pelo fabricante são cumpridas, caso qualquer controlo não cumpra as especificações abaixo indicadas, o ensaio deve ser considerado inválido e os resultados do doente não deverão ser documentados. O operador pode repetir o ensaio, após revisão do procedimento, ou contactar o fabricante. Se repetir o ensaio, prepare uma diluição nova para cada amostra. Os laboratórios podem optar por incluir controlos internos para cada teste de ensaio. Conserve este tipo de material de controlo a temperatura igual ou inferior a -20°C e evite ciclos repetidos de congelação/descongelação. Os conservantes, como azida de sódio a <0,1% (p/v), não afectam os resultados da amostra.
Os intervalos de referência e os valores de corte adequados devem ser calculados para as populações específicas avaliadas pelos utilizadores.

Tabela 1. Especificações para o controlo baixo e controlo alto.

Especificações do controlo	Controlo baixo	Controlo alto
Média do duplicado	15 a 35 pmol/L	36 a 84 pmol/L

11.3 Valores previstos

135 amostras de soro de dadores assintomáticos e aparentemente saudáveis, com idades compreendidas entre 18 e 75 anos, compreendendo aproximadamente números iguais de homens [n = 65] e mulheres [n = 70], foram testadas no EIA BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin).
A média geral da concentração de BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) para esta população foi de 72 pmol/L (intervalo de 15 a 147 pmol/L). Com base nos dados desta população de referência, o intervalo de referência (95% centrais dos resultados) é:

Intervalo de referência	21 – 123 pmol/L

Este intervalo de referência é sugerido apenas como uma orientação e cada laboratório deve estabelecer um intervalo de referência próprio que pode ser único para a população abrangida, de acordo com factores geográficos, dietéticos, ambientais, relacionados com o doente ou com a prática clínica.

12. DADOS DE DESEMPENHO

Dados ilustrativos; os resultados em laboratórios individuais podem ser diferentes.

12.1 Linearidade da diluição

Com base na orientação do documento EP6-A[10] do CLSI, o BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) demonstrou linearidade em todo o intervalo de medição do ensaio, conforme demonstrado num estudo entre 5,3 e 156,0 pmol/l (arredondado à primeira casa decimal); os resultados de laboratórios individuais podem ser diferentes destes dados.

12.2 Exactidão

Um estudo de correlação foi realizado com amostras de soro de adultos aparentemente saudáveis. Todas as amostras foram analisadas com o EIA BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) e um ensaio disponível no mercado para holotranscobalamina de acordo com o documento EP9-A2[11] do CLSI. As concentrações das amostras situaram-se entre 13,8 a 112,8 pmol/l no ensaio. A Tabela 2 apresenta os valores estatísticos obtidos.

Tabela 2. EIA BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) comparado com um ensaio disponível no mercado.

EIA BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) comparado com um ensaio disponível no mercado	
Número de amostras	111
Declive da linha de regressão (regressão de Passing-Bablok) (IC de 95%)	0,95 (0,89 a 1,01)
Intercepção sobre Y (regressão de Passing-Bablok) (IC de 95%)	8,39 (5,73 a 11,77)
Coeficiente de correlação (r) (Pearson) (IC de 95%)	0,93 (0,90 a 0,95)

12.3 Precisão

Sete (7) amostras de soro humano foram analisadas usando 3 lotes de reagentes. As amostras foram analisadas por 2 operadores em 8 replicados, uma vez por dia durante 5 dias (n=80). Os dados deste estudo estão resumidos na Tabela 3:

Tabela 3. Dados sobre a precisão.

Amostra	n	Lote	Operador	Média (pmol/L)	% de CV intra-ensaio	% de CV total
1 A	80	1	1	17,8	7,5%	8,2%
			2	17,5	3,1%	9,3%
		2	1	20,1	6,0%	6,6%
			2	20,3	6,9%	9,2%
		3	1	19,1	5,5%	8,0%
			2	18,9	8,5%	11,0%
2 A	80	1	1	21,8	5,5%	9,9%
			2	21,8	3,9%	7,5%
		2	1	22,6	5,6%	8,7%
			2	23,5	9,0%	10,3%
		3	1	23,9	7,0%	10,2%
			2	23,2	5,8%	8,9%
3 A	80	1	1	28,8	3,8%	7,8%
			2	30,7	4,3%	9,6%
		2	1	31,0	6,8%	8,0%
			2	31,4	4,3%	6,1%
		3	1	31,5	4,5%	6,4%
			2	32,2	4,0%	9,2%
4 A	80	1	1	49,3	3,9%	7,4%
			2	52,6	4,1%	6,7%
		2	1	50,8	5,6%	10,0%
			2	51,7	4,7%	5,9%
		3	1	52,6	4,6%	4,8%
			2	55,0	5,5%	6,1%
5 A	80	1	1	68,4	4,0%	7,6%
			2	73,2	3,7%	7,5%
		2	1	74,8	4,3%	8,2%
			2	75,9	4,6%	6,4%
		3	1	75,1	4,4%	7,9%
			2	76,3	4,9%	6,2%
7 A	80	1	1	115,9	4,2%	5,9%
			2	121,1	3,6%	7,0%
		2	1	123,2	4,3%	10,2%
			2	124,0	4,2%	6,4%
		3	1	127,0	4,8%	10,1%
			2	129,5	3,2%	5,6%
Controlo baixo	80	1	1	23,7	9,4%	10,9%
			2	23,8	5,1%	11,5%
		2	1	20,0	6,0%	7,5%
			2	18,6	5,8%	8,5%
		3	1	20,3	8,3%	9,7%
			2	20,1	8,3%	10,0%
Controlo alto	80	1	1	61,2	6,3%	6,4%
			2	58,8	4,5%	8,9%
		2	1	50,3	6,3%	8,1%
			2	50,2	5,9%	8,4%
		3	1	52,2	7,7%	9,2%
			2	50,8	5,8%	8,5%

12.4 Limite de branco

Num estudo representativo, foram efectuadas determinações do limite de branco utilizando duas amostras de holotranscobalamina de concentração baixa e dois lotes de reagentes (120 replicados por lote de reagente). Verificou-se que o limite de branco do EIA BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) era de 4,9 pmol/l (arredondado à primeira casa decimal).

12.5 Limite de detecção

Num estudo representativo, foram efectuadas determinações do limite de detecção utilizando cinco amostras de holotranscobalamina de concentração baixa e dois lotes de reagentes (120 replicados por lote de reagente). Verificou-se que o limite de detecção do EIA BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) era de 8,1 pmol/l (arredondado por excesso à primeira casa decimal).

12.6 Limite de quantificação

As determinações do limite de quantificação foram efectuadas utilizando cinco amostras de holotranscobalamina de concentração baixa e dois lotes de reagentes (120 replicados por lote de reagente). Verificou-se que o limite de quantificação do EIA BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) era de 8,3 pmol/l (arredondado à primeira casa decimal).

12.7 Efeito de gancho de dose elevada ("High Dose Hook")

O efeito de gancho de dose elevada é um fenómeno em que amostras com níveis muito elevados podem ter leituras dentro do intervalo dinâmico do ensaio. Com o EIA BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin), não foi detectado efeito de gancho de dose elevada em duas amostras com uma concentração de aproximadamente 419 e 2236 pmol/l.

12.8 Reactividade cruzada

O BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) foi concebido para assumir um desvio máximo na concentração de holotranscobalamina de ≤10% na presença de apotranscobalamina ou haptocorrina.
Foi efectuado um estudo tendo por base as orientações do documento EP7-A2[12] do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Três amostras com níveis de holotranscobalamina ao longo do intervalo de medição do ensaio foram suplementadas com 500 pmol/L de apotranscobalamina ou 5000 pmol/L de haptocorrina. O desvio máximo na concentração de holotranscobalamina situou-se entre -5% e 1%.

12.9 Interferência

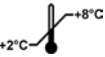
O BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) foi concebido para assumir um desvio máximo na concentração de holotranscobalamina de ≤10% na presença de compostos potencialmente interferentes.
Foi efectuado um estudo tendo por base as orientações do documento EP7-A2[12] do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Amostras com níveis de holotranscobalamina ao longo do intervalo de ensaio foram suplementadas com os compostos potencialmente interferentes listados na Tabela 4 abaixo. O desvio máximo na concentração de holotranscobalamina situou-se entre –10% e 8%.

Tabela 4. Lista de compostos interferentes testados.

Substância potencialmente interferente	Interferência não encontrada até à concentração seguinte
Hemoglobina	500 mg/dL
Bilirrubina	30 mg/dL
Triglicérido (solução intra-lipídica)	3000 mg/dL
Factor reumatóide	7500 UI/dL
Proteína total	9000 mg/dL

13. GARANTIA

O Biohit deve solucionar todos os defeitos detectados em qualquer Produto (o “Produto com defeito”) que resultarem de materiais inadequados ou de fabricação negligente e que impeçam o funcionamento mecânico ou a utilização prevista dos Produtos, incluindo, sem limitação, as funções descritas nas especificações Biohit para os Produtos. NO ENTANTO, QUALQUER GARANTIA SERÁ CONSIDERADA NULA SE A FALHA FOR CAUSADA POR TRATAMENTO INADEQUADO, UTILIZAÇÃO INADEQUADA, DANOS ACIDENTAIS, ARMAZENAMENTO INCORRETO OU USO DOS PRODUTOS PARA OPERAÇÕES FORA DE SUAS LIMITAÇÕES ESPECIFICADAS OU FORA SUAS ESPECIFICAÇÕES, CONTRÁRIAS ÀS INSTRUÇÕES DETERMINADAS NO MANUAL DE INSTRUÇÕES. O período dessa garantia é definido no manual de instruções dos Produtos e começará a partir da data em que o Produto relevante for enviado pela Biohit. Esse kit de diagnóstico Biohit foi fabricado de acordo com os protocolos de gestão de qualidade ISO 9001/ISO 13485. Em caso de litígio de interpretaçãoo texto em Inglês aplica.

14. INFORMAÇÕES SOBRE PEDIDOS

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin)   Cat. No 602 290

15. DATA DE PUBLICAÇÃO

BIOHIT Active B12 (Holotranscobalamin) Version 01, October 2014.

16. REFERÊNCIAS

1. Nexo E. Hvas A-M. Bleie Ø *et al*. Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002;48(10):1768-71.
2. Valente E. Scott JM. Ueland PM *et al*. Diagnostic accuracy of holotranscobalamin. methylmalonic acid. serum cobalamin. and other indicators of tissue vitamin B12 status in the elderly. *Clin Chem* 2011;57(6):856-863.
3. Nexo E. Hoffmann-Lucke E. Holotranscobalamin. a marker of vitamin B12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr* 2011;94(1):359S-365S.
4. Obeid R. Jouma M. Hermann W. Cobalamin status (holotranscobalamin. methylmalonic acid) and folate as determinants of homocysteine concentration. *Clin Chem* 2002;48(11):2064-5.
5. Herrmann W. Schorr H. Obeid R *et al*. Vitamin B12 status. particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003;78:131-6.
6. Lloyd-Wright Z. Hvas A-M. Moller J *et al*. Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2003;49(12):2076-8.
7. Refsum H. Yajnik CS. Gadkari M *et al*. Hyperhomocysteinemia and elevated methylmalonic acid indicate a high prevalence of cobalamin deficiency in Asian Indians. *Am J Clin Nutr* 2001;74:233-41.
8. Refsum H. Smith AD. Low Vitamin B12 status in confirmed Alzheimer's disease as revealed by serum holotranscobalamin. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:959-61.
9. Chen X. Remacha AF. Sarda MP *et al*. Influence of cobalamin deficiency compared with that of cobalamin absorption on serum holo-transcobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2005;81:110-14.
10. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.* NCCLS document EP6-A. Wayne. PA: NCCLS; 2003.
11. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline–Second Edition*. NCCLS Document EP9-A2. Wayne. PA: NCCLS; 2002.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Interference Testing in Clinical Symbols*.

Symbol	Significado	Symbol	Significado
IVD	Para utilização em diagnóstico *in vitro*	CONTROL LOW	Controlo baixo
REF	Número de catálogo	CONTROL HIGH	Controlo alto
LOT	Código de lote	CONJ	Conjugado
Σ 96	96 testes	SUBS	Substrato
	Cuidado	STOP	Solução de paragem
i	Consultar as instruções de utilização	PRE	Pré-tratamento
	Proteger da luz	WASH 8x	Concentrado de tampão de lavagem (8x)
	Prazo de validade	BLANK	Solução em branco
+2°C +8°C	Conservar a 2-8°C	CAL 1-5	Calibradores 1 a 5
			Corrosivo
2	Não reutilizar		Nocivo

Sede Principal

Headquarters

BIOHIT OYJ

Laippatie 1

00880 Helsinki, Finland

Tel: +358 9 773 861

Fax: +358 9 773 86200

E-mail: info@biohit.fi

www.biohithealthcare.com

400920-01